

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
22 novembre 2001 (22.11.2001)

PCT

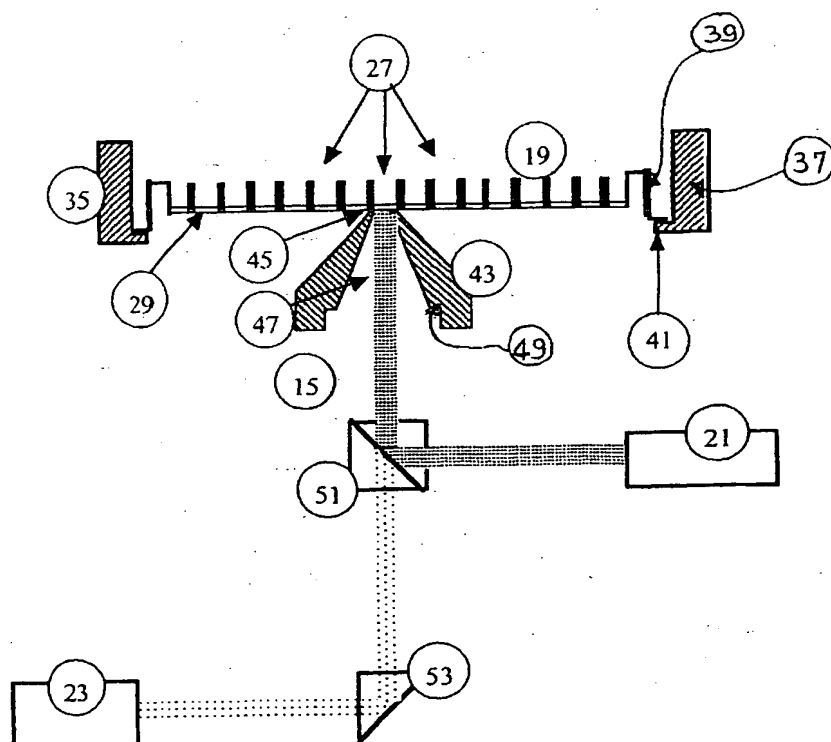
(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/88593 A1**

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : G02B 21/26 (72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DE-  
(21) Numéro de la demande internationale : LAAGE, Michel [FR/FR]; 16, rue Adolphe Thiers, F-13001 Marseille (FR). VILLA, Pascal [FR/FR]; Résidences de la Rade, Bâtiment C9, Avenue Ganteaume, F-13260 Cassis (FR). WILLIAMSON, Toni, Louise [GB/FR]; Résidence le Cézanne, Bâtiment C1, Avenue Leriche, F-13260 Cassis (FR).  
(22) Date de dépôt international : 10 mai 2001 (10.05.2001)  
(25) Langue de dépôt : français  
(26) Langue de publication : français  
(30) Données relatives à la priorité : 00/06125 15 mai 2000 (15.05.2000) FR (81) États désignés (national) : CA, JP, US.  
(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : TROPHOS SA [FR/FR]; Parc Scientifique Luminy, Boîte Postale 931, F-13288 Marseille Cedex 09 (FR). (84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DEVICE FOR SEQUENTIAL OBSERVATION OF SAMPLES AND METHODS USING SAME

(54) Titre : DISPOSITIF D'OBSERVATION SEQUENTIELLE D'ECHANTILLONS ET PROCEDES L'UTILISANT



POSITIONING THE PLATE ON THE OBJECTIVE  
Positionnement de la plaque sur l'objectif

(57) Abstract: The invention concerns methods and devices for observing or analysing samples on a support. More particularly, it concerns a device for sequential observation of several samples arranged on a common plate (19) comprising an objective (15) for observing a stage (17) for positioning the plate (19) adapted to ensure a relative displacement between the plate (19) and the observation axis in a plane perpendicular to the observation axis, while leaving free the vertical displacement along the observation axis, means (21) for illuminating the sample and means (23, 25) for acquiring an image at the objective (15) output. It comprises a spacer (43) fixed relative to the objective (15) and having a support surface (45) on the support (19), said support surface being located proximate to the observation axis, so that said spacer (43) is adapted to maintain, on the observation axis, a constant distance between the objective (15) and the observation surface (29), during a relative displacement between the support (19) and the observation axis. The invention is useful for rapid analysis of cell samples.

[Suite sur la page suivante]

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**(57) Abrégé :** La présente invention concerne des procédés et dispositifs pour l'observation ou l'analyse d'échantillons sur un support. Plus particulièrement, il s'agit d'un dispositif pour l'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés sur une même plaque (19) comportant un objectif (15) d'observation d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face d'observation (29) de la plaque (19), une platine (17) de positionnement de la plaque (19) adaptée pour assurer un déplacement relatif entre la plaque (19) et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation, tout en laissant libre le déplacement vertical le long de l'axe d'observation, des moyens (21) d'illumination de l'échantillon et des moyens (23, 25) d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif (15). Il comporte une entretoise (43) fixe par rapport à l'objectif (15) et présentant une surface d'appui (45) sur le support (19), ladite surface d'appui étant située au voisinage de l'axe d'observation, de sorte que ladite entretoise (43) est adaptée pour maintenir, sur l'axe d'observation, une distance constante entre l'objectif (15) et la face d'observation (29), au cours d'un déplacement relatif entre le support (19) et l'axe d'observation. Application à l'analyse rapide d'échantillons cellulaires.

## Dispositif d'observation séquentielle d'échantillons et procédés l'utilisant

La présente invention concerne des procédés et dispositifs pour  
5 l'observation ou l'analyse d'échantillons sur un support. Elle concerne plus particulièrement un dispositif permettant l'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés côte à côte sur un même support, notamment une même plaque.

Ce dispositif, notamment de type microscope, comporte un objectif  
10 d'observation d'au moins une partie d'un échantillon suivant un axe d'observation depuis une face d'observation du support et une platine de positionnement du support adaptée pour assurer un déplacement relatif entre le support et l'axe d'observation dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation mais laissant libre le déplacement le long de l'axe d'observation supposé vertical. Il comporte  
15 en outre des moyens d'illumination d'au moins une partie d'un échantillon et des moyens d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif.

Un tel dispositif est utilisé notamment pour l'analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons disposés sur un même support, tel qu'une plaque, ces échantillons étant constitués par exemple de cellules, en particulier de cellules  
20 adhérentes, mammaliennes, procaryote, végétale, etc. ou d'autres organismes par exemple pathogènes (virus, etc.).

L'analyse cellulaire rapide sur un grand nombre d'échantillons est une nécessité dans l'industrie pharmaceutique, pour le balayage à haut débit de nouvelles substances actives, et dans l'industrie des cosmétiques, où des  
25 modèles cellulaires sont utilisés pour tester de nouvelles substances et contrôler les fabrications. Ces industries souhaitent utiliser de plus en plus de tests cellulaires et demandent une simplification de leur mise en œuvre.

Les plaques de culture couramment utilisées pour contenir les échantillons biologiques (notamment cellulaires) ont une forme générale de plateau. Elles  
30 présentent un ensemble d'alvéoles adjacents appelés puits dans tout ou partie desquels est contenu un échantillon. Ces puits sont généralement d'axes parallèles les uns aux autres et s'étendent suivant l'épaisseur de la plaque. Ils débouchent à la surface supérieure de la plaque et sont obturés par un fond

formant généralement la face inférieure de la plaque. Les fonds de puits adjacents sont donc généralement reliés les uns aux autres. Ainsi, la face inférieure de la plaque est essentiellement continue. D'autres supports pour l'analyse d'échantillons biologiques sont par exemple des membranes, lames de verre, filtres, ou tout autre support translucide ou opaque etc.

Pour procéder à l'observation microscopique des échantillons, la plaque (ou tout autre support) est disposée au-dessus ou au-dessous de l'objectif du microscope dont l'axe est orienté verticalement. L'observation s'effectue au travers du fond de chaque puits, c'est-à-dire au travers de la face inférieure de la plaque, cette face inférieure constituant la face d'observation, ou directement au-dessus de l'échantillon. Les échantillons sont amenés un à un en regard de l'objectif par déplacement de la plaque dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation grâce à la platine de positionnement. Cette dernière est adaptée pour maintenir la plaque essentiellement ou seulement à sa périphérie, laissant ainsi libre la face d'observation de la plaque. En outre, la platine est adaptée pour laisser à la plaque une certaine liberté de mouvement dans l'axe d'observation.

Les plaques sont généralement réalisées dans un matériau coulé ou moulé, le plus souvent en polystyrène. De ce fait, les plaques comportent le plus souvent des défauts de planéité de leur face inférieure formant le fond des puits. La taille de ces défauts dépasse largement la profondeur de champ de l'objectif. L'écart entre les points extrêmes de la face inférieure atteint couramment 0,2 à 0,3 mm.

Les défauts de planéité de la face inférieure de la plaque et sa déformation font varier la distance entre l'objectif et l'échantillon à analyser. Il est donc nécessaire, pour procéder à l'observation d'une plaque complète ou d'échantillons distribués dans des puits répartis sur une zone importante de la surface de la plaque, de corriger fréquemment la mise au point de l'objectif pour compenser la variation de cette distance.

Cet inconvénient se constate par exemple dans les microscopes à fluorescence conventionnels, dotés d'une caméra CCD et d'un logiciel de morphométrie. Le même problème se pose pour la lecture par contraste de phase telle que proposée par certains matériels.

La mise au point automatique sur ce type de matériels est lente et peu fiable : un puits vide peut entraîner une instabilité du système, voire une mise au point erronée sur un accident de la face externe.

La nécessité de procéder fréquemment à un réglage de la mise au point de l'objectif réduit la vitesse d'acquisition des images des échantillons.

Un problème analogue se produit lors de l'analyse de micro-particules qui sont de plus en plus utilisées pour effectuer des réactions biochimiques, lorsque ces micro-particules sont disposées dans les puits d'une plaque.

De même, la recherche de bactéries sur des filtres oblige à régler fréquemment la mise au point de l'objectif du fait des défauts de planéité du filtre.

Un autre inconvénient est l'utilisation de lampes à mercure et/ou halogène, qui ne permettent pas de réaliser un éclairage stable et homogène.

L'invention a pour but, suivant un premier aspect, d'apporter une solution à ce problème d'acquisition des images en proposant un dispositif, notamment de type microscope, qui puisse fonctionner à une cadence élevée même avec des supports dont la planéité de la face d'observation est imparfaite.

A cet effet, l'invention a pour objet un dispositif tel que défini ci-dessus, plus particulièrement de type microscope, caractérisé en ce qu'il comporte une entretoise fixe par rapport à l'objectif et présentant une surface d'appui sur le support, ladite surface d'appui étant située au voisinage de l'axe d'observation et le support étant libre selon l'axe vertical d'observation, de sorte qu'il garde le contact avec ladite entretoise dont la dimension est adaptée pour maintenir, sur l'axe d'observation, une distance constante entre l'objectif et la face d'observation, au cours d'un déplacement relatif entre le support et l'axe d'observation.

L'invention a également pour but de faciliter la vitesse et la qualité de l'acquisition des signaux, et d'offrir la possibilité d'excitation de l'échantillon sur l'ensemble du champ d'analyse, sans nécessité de balayage au sein d'un même échantillon.

L'invention propose également, suivant un deuxième aspect, une solution aux inconvénients de certaines sources lumineuses utilisées dans l'art antérieur qui sont coûteuses (laser), peu stables ou de durée limitée (lampe mercure).

Suivant d'autres caractéristiques de l'invention :

- le dispositif comporte des moyens de réglage de la distance entre l'objectif et la surface d'appui ; et

- le support est une plaque, notamment une plaque multi-puits  
5 comportant 96, 384, 864 ou 1536 puits.

Bien que l'emploi de plaques constitue le mode préféré de mise en œuvre, il est entendu que le dispositif d'analyse ou d'observation selon l'invention peut être utilisé avec d'autres supports tels que des membranes, filtres, etc., plus généralement tout support utilisé par l'homme du métier pour le dépôt  
10 d'échantillon biologiques, notamment tout support non parfaitement plan sur lequel plusieurs échantillons à analyser sont déposés.

Suivant encore d'autres caractéristiques de l'invention :

- l'entretoise comporte un manchon s'étendant suivant l'axe d'observation, la surface d'appui étant formée par une plage annulaire  
15 d'extrémité du manchon ;

- les moyens d'acquisition et les moyens d'illumination comportent des moyens d'autocalibration pour réaliser une correction d'uniformité du faisceau d'illumination à partir de l'observation de billes fluorescentes de référence disposées sur la plaque portant les échantillons ;

- les moyens d'illumination sont adaptés pour couvrir simultanément  
20 l'essentiel de la surface d'un échantillon et l'objectif et les moyens d'acquisition sont adaptés pour procurer un champ d'observation couvrant simultanément l'essentiel de la surface de l'échantillon ;

- les moyens d'illumination comprennent au moins une source  
25 lumineuse constituée d'une lampe, d'un laser, ou d'un ensemble de diodes électroluminescentes;

- ladite source lumineuse comprend des diodes électroluminescentes émettant à au moins deux longueurs d'onde différentes ;

- le dispositif comporte au moins une lentille permettant de faire  
30 converger la lumière émise par la source sur l'échantillon ou une partie de celui-ci ;

- le dispositif comporte un ensemble de lentilles individuelles, chacune étant associée à une diode respective ;

- le dispositif comporte une lentille, notamment une lentille de Fresnel, interposée entre les diodes électroluminescentes et le support ;
- le dispositif comporte un nombre de diodes adapté pour amener sur l'objet une illumination ou un éclaircissement correspondant à une puissance au moins égale à 2 mW ; et/ou
- les diodes électroluminescentes sont disposées en couronne autour de l'objectif.

Suivant des modes particuliers de réalisation de l'invention :

- ladite source lumineuse est solidaire de l'entretoise.
- l'entretoise est interposée entre la face d'observation du support et l'objectif, et présente une surface d'appui sur la face d'observation ;
- l'entretoise est portée par l'objectif ;
- l'objectif est disposé au-dessus du support, tandis que l'entretoise est disposée au-dessous du support dans l'axe d'observation, de sorte que sa surface d'appui porte sur la face du support opposée à la face d'observation, et est solidaire d'une pièce fixe par rapport à l'objectif ;
- les moyens d'illumination comportent des moyens de guidage du faisceau d'illumination au travers de l'entretoise ou du manchon ; et
- les moyens de guidage du faisceau d'illumination comportent une fibre optique.

L'invention a également pour objet un dispositif d'observation ou d'analyse d'un ou plusieurs échantillons disposés sur un support, du type décrit précédemment, caractérisé en ce que les moyens d'illumination comportent un ensemble de diodes électroluminescentes.

Suivant des modes particuliers de réalisation de l'invention :

- ledit ensemble comprend des diodes électroluminescentes émettant à au moins deux longueurs d'onde différentes ;
- le dispositif comporte au moins une lentille permettant de faire converger la lumière émise par ledit ensemble de diodes sur l'échantillon ou une partie de celui-ci ;
- le dispositif comporte un ensemble de lentilles individuelles, chacune étant associée à une diode respective ;

REC'D 11 JUN 2001

6

WIPO

PCT

- le dispositif comporte une lentille, notamment une lentille de Fresnel, interposée entre les diodes électroluminescentes et le support ;
- le dispositif comporte un nombre de diodes adapté pour produire une lumière correspondant à une puissance au moins égale à 2 mW sur l'objet; et
- 5       - les diodes électroluminescentes sont disposées en couronne autour de l'objectif.

10       L'invention a tout particulièrement pour objet un microscope, notamment un microscope d'observation séquentielle d'échantillons disposés (côte à côte) sur une même plaque, tel que décrit précédemment.

15       Ainsi cette face d'observation, libre dans l'axe vertical, reste à une distance fixe de l'objectif au voisinage de l'axe optique, définie par la longueur de l'entretoise, laquelle est ajustée de sorte que l'image des objets situés sur la face opposée de la face d'observation soit au point sur le capteur.

20       L'invention a en outre pour objet un procédé d'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés sur un même support, notamment sur une même plaque, plus particulièrement côte à côte, ou plus généralement d'analyse d'un ou plusieurs échantillons, caractérisé en ce qu'il comporte l'utilisation d'un dispositif tel que défini ci-dessus.

25       L'invention concerne aussi l'utilisation d'un dispositif tel que défini ci-avant pour l'analyse d'un ou plusieurs échantillons, comme par exemple pour l'analyse ou la détection d'acides nucléiques, de polypeptides, lipides, organelles, etc., notamment pour des applications de recherche, diagnostique, screening industriel de bibliothèques de produits, etc.

      L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante, donnée uniquement à titre d'exemple et faite en référence aux dessins sur lesquels :

- 30       - la figure 1 est une vue schématique en perspective d'un analyseur selon l'invention ;



- la figure 2 est une vue schématique en coupe dans un plan vertical contenant l'axe d'observation, dans la région de la plaque de culture, de l'analyseur de la figure 1 suivant un premier mode de réalisation de l'invention ;

- la figure 3 est une vue analogue d'un objectif et d'une coiffe d'objectif réglable formant entretoise, représentés seuls, selon un deuxième mode de réalisation de l'invention ;

- la figure 4 est une vue analogue d'un objectif et d'une coiffe d'objectif intégrant des sources lumineuses (diodes électroluminescentes), suivant un troisième mode de réalisation de l'invention; et

10 - la figure 5 est une vue schématique en coupe dans un plan vertical contenant l'axe d'observation d'un microscope, et notamment de l'entretoise associée de maintien de la mise au point, dans une configuration en montage droit (observation par le dessus), suivant un quatrième mode de réalisation de l'invention.

15

l'analyseur 11 représenté sur la figure 1 est destiné plus particulièrement à l'observation de la fluorescence d'échantillons (notamment cellulaires) contenus dans les puits d'une plaque de titration (ou de culture).

Il comporte essentiellement un bâti 13 portant un objectif d'observation 15 et une platine 17 de positionnement d'une plaque de titration 19 qui laisse libre les déplacements verticaux du support d'échantillon, une source 21 d'illumination locale de la plaque, une caméra 23 placée en arrière de l'objectif 15 et une unité de traitement d'informations 25, tel qu'un micro-ordinateur, reliée à la caméra 23.

25 Ce microscope est adapté pour l'observation rapide d'échantillons contenus dans des puits adjacents 27 de la plaque 19, visibles sur la figure 2.

Comme représenté sur la figure 2, les plaques utilisées comportent préférentiellement une face inférieure continue 29 formant le fond des puits 27 et constituant une face d'observation au travers de laquelle les échantillons sont observés. Les puits 27 s'ouvrent à la surface supérieure de la plaque. Ils sont 30 sensiblement cylindriques de section circulaire ou carrée et ont un fond essentiellement plan (partie intérieure du fond du puits). Dans la figure 2 on a représenté en coupe une plaque de 384 puits carrés de côté environ 3 mm, même si le dispositif peut être adapté à toute autre dimension.

Les plaques utilisées comportent généralement 96, 384, 864 ou 1536 puits. Leurs dimensions sont par exemple 107 mm x 71 mm. De telles plaques sont disponibles dans le commerce (Nunc (Danemark), Greiner (Allemagne), Costar, Falcon (U.S.A.), etc.).

5 On se réfère maintenant de nouveau à la figure 1.

Le bâti 13 est par exemple celui d'un microscope inversé équipé pour l'épi-illumination. Il comporte une tourelle 31 supportant l'objectif 15 de telle sorte que son axe d'observation s'étende sensiblement verticalement.

10 L'objectif 15 a de préférence un faible grossissement par exemple compris entre 1,25 et 5. Avantageusement, son grossissement est de 2,5 ou 5. Le grossissement est ramené à une valeur proche, par défaut, du rapport entre les dimensions du capteur et celles de l'objet, par des lentilles placées dans la bague allonge qui supporte le capteur. L'objectif a une grande ouverture numérique. En particulier, celle-ci est adaptée pour que le champ d'observation  
15 de l'objectif couvre toute la surface du fond d'un puits.

La platine 17 est solidaire du bâti 13. Elle est maintenue sensiblement horizontalement en regard de l'objectif 15. Cette platine comporte, comme connu en soi, une structure porteuse 33 fixée au bâti 13 et un cadre 35 de support de la  
20 plaque 19. Ce cadre s'étend dans un plan sensiblement perpendiculaire à l'axe d'observation. Il est mobile à coulissement dans ce plan par rapport à la structure porteuse 33. A cet effet, le cadre est guidé par rapport à la structure porteuse entre des paires de glissières s'étendant suivant deux directions perpendiculaires du plan. Deux actionneurs électriques assurent le déplacement du cadre 35 suivant ces deux directions. Le cadre est sensiblement plus grand  
25 que le support, avec un jeu de 0,1 mm ou moins, par exemple, pour laisser libre les mouvements verticaux.

L'unité de traitement d'informations 25 met en œuvre un programme pilotant la source 21, la caméra 23, et la platine de positionnement 17. En particulier, elle assure la mise en place successive de chacun des échantillons  
30 de la plaque en regard de l'objectif et l'acquisition d'une image de chaque échantillon.

L'unité 25 met en outre en œuvre un programme de traitement et d'analyse de l'image acquise de chaque échantillon. Ces traitements comportent par

exemple des traitements primaires, tels que des histogrammes de pixels et des analyses d'amas (clusters en langue anglaise), ainsi que des traitements secondaires tels que des corrections d'excitation, des comparaisons entre puits et des statistiques.

- 5 Par ailleurs, l'unité 25 peut réaliser une correction d'uniformité de la lumière excitatrice, ceci à partir de billes fluorescentes de référence disposées dans un ou plusieurs puits de la plaque.

Comme représenté sur la figure 2, le cadre 35 présente quatre cotés 37 s'étendant le long du contour de la plaque 19. Les dimensions des cotés 37 sont  
10 adaptées pour qu'ils s'appliquent en contact intime avec les bords notés 39 de la plaque, tout en autorisant le libre mouvement de la plaque 19 suivant la direction de l'axe d'observation.

Intérieurement, le cadre 35 présente un rebord périphérique 41 formant une surface d'appui pour la plaque 19 en dehors des périodes d'observation. Lors  
15 des périodes d'observation, la plaque 19 est à l'écart de cette surface d'appui ou au plus, la plaque ne repose que partiellement sur celle-ci.

Selon l'invention, un manchon 43 formant entretoise est solidaire de l'objectif 15. Il prolonge celui-ci axialement et définit, à son extrémité libre, une  
20 surface 45 pour l'appui de la face inférieure de la plaque 19 dans le voisinage immédiat du fond du puits contenant l'échantillon à observer. L'autre extrémité du manchon 43 s'appuie sur le bout de l'objectif 15.

Le manchon 43 présente une forme générale tronconique. Il définit intérieurement un conduit axial 47 permettant l'illumination et l'observation de toute la surface d'un échantillon depuis l'objectif 15. Le diamètre du conduit est  
25 progressivement décroissant de l'extrémité du manchon en appui sur l'objectif jusqu'à l'extrémité libre du manchon définissant la surface d'appui 45. Son diamètre varie ainsi de 12 mm à 4,5 mm. La hauteur du conduit 47 est par exemple d'environ 20 mm. Il peut varier par exemple de 10 à 30 mm selon l'objectif choisi.

30 La surface d'appui 45 est plane et forme une couronne d'appui entourant le fond du puits contenant l'échantillon à observer.

A l'extrémité du manchon en appui sur l'objectif 15, le conduit 47 présente un épaulement 49 définissant une surface annulaire suivant laquelle le manchon repose sur l'objectif.

La source d'illumination 21 est formée par une lampe, un laser ou un ensemble de diodes électroluminescentes. Elle est adaptée pour provoquer une irradiation de l'échantillon conduisant celui-ci à émettre un rayonnement propre par un phénomène de fluorescence.

Les fluorophores utilisés sont ceux du marquage cellulaire de l'échantillon tel que le marquage de surface, le marquage intramembranaire, le marquage cytoplasmique, le marquage métabolique (pH, activité respiratoire), le marquage des ARN et ADN non spécifique ou spécifique (Fish), ou le marquage de polypeptides (enzymes, récepteurs de surface, protéines cytoplasmiques ou nucléaires, etc.), par exemple.

Le laser utilisé pour la source 21 est par exemple un laser hélium-néon dont la longueur d'onde est 543 nm, un laser argon de longueur d'onde égale à 488 nm, un laser solide à doublement de fréquence dont la longueur d'onde est égale à 532 nm ou une diode laser de longueur d'onde définie dans une plage allant du bleu au rouge.

Dans un mode de réalisation préféré, la source 21 est formée par un laser Argon de longueur d'onde égale à 488 nm, la puissance du laser étant fixée à 25 mW.

Un prisme 51 de renvoi du faisceau incident issu de la source 21 est disposé en arrière de l'objectif 15 pour diriger le faisceau incident suivant l'axe optique de l'objectif 15 en direction de l'échantillon. Ainsi, le faisceau servant à l'excitation traverse l'objectif assurant une observation de l'échantillon par épifluorescence. Pour des raisons de clarté de la figure 2, les axes optiques de la source 21 et de la caméra 23 sont représentés comme étant parallèles alors qu'ils sont en fait perpendiculaires entre eux.

En variante, le faisceau issu de la source d'illumination est guidé jusqu'à l'échantillon par un miroir ou une fibre optique permettant l'illumination de l'échantillon sans traverser l'objectif.

La caméra 23 utilisée comporte avantageusement une matrice de capteurs à couplage de charge, couramment désignés par capteurs CCD. Elle est

sensible au rayonnement ré-émis par l'échantillon par phénomène de fluorescence et est adaptée pour produire une image représentative de ce rayonnement.

La caméra est choisie pour pouvoir acquérir simultanément l'image  
5 complète d'un échantillon, c'est-à-dire que son champ est suffisamment large pour couvrir le fond d'un puits, en tenant compte de la modification du faisceau opérée par l'objectif 15.

La caméra comporte avantageusement la possibilité de régler le temps d'acquisition et un dispositif de refroidissement du capteur en vue de réduire le  
10 bruit de fond.

La caméra est disposée avec son axe optique perpendiculaire à l'axe d'observation. Un prisme ou un miroir incliné 53 est prévu en arrière de l'objectif 15 pour dévier le faisceau en sortie de l'objectif vers la caméra 23. Un filtre dichroïque peut également être inséré pour éliminer la lumière excitatrice.

15 D'autres dispositions sont possibles, où l'axe de la caméra coïncide avec celui de l'observation par exemple.

Pour l'observation du contenu d'une plaque, les moyens de positionnement assurent un déplacement de la plaque dans le plan perpendiculaire à l'axe d'observation pour amener successivement chaque échantillon en regard de  
20 l'objectif. Pendant ce déplacement et pendant l'observation proprement dite d'un échantillon, la plaque est maintenue, sous l'action de son propre poids, en appui sur l'extrémité du manchon 43. En effet, de part sa structure, la platine de positionnement autorise un libre débattement vers le haut de la plaque suivant la direction de l'axe d'observation. La plaque ne repose alors au plus que  
25 partiellement sur le rebord 41 de la platine.

Pendant le déplacement de la plaque sous l'action des moyens de positionnement, la plaque glisse sur la surface d'appui 45 définie à l'extrémité du manchon sur laquelle s'appuie la plaque.

Pendant l'observation, l'échantillon à observer est situé entièrement à  
30 l'intérieur de la zone d'appui délimitée par le manchon sur la surface d'observation de la plaque, zone elle-même centrée par l'axe optique. Ainsi, la distance définie entre l'échantillon et l'objectif est la même pour tous les

échantillons de la plaque, quelle que soit la planéité de la face d'observation de la plaque. En effet, cette distance est fixée par la seule longueur du manchon 43.

Ainsi, la mise au point de l'objectif n'a pas à être refaite par les moyens d'autofocalisation pour chaque échantillon, ce qui diminue considérablement la durée totale d'analyse de l'ensemble des échantillons portés par une même plaque.

Par ailleurs, comme le champ d'observation de la caméra 23 coïncide avec le champ d'excitation de la source 21, ceux-ci couvrant la totalité du fond d'un puits et donc toute la surface de l'échantillon, l'image complète d'un échantillon peut être acquise simultanément, sans qu'il soit nécessaire de procéder à un balayage de l'échantillon. Ainsi, l'acquisition d'une image s'effectue rapidement.

Suivant la variante de réalisation représentée sur la figure 3, le manchon 143 est constitué d'une première 143A et d'une deuxième 143B parties, vissées l'une dans l'autre. La première partie 143A du manchon 143 est fixée sur l'objectif 15, . La première partie 143A s'ajuste et porte sur l'objectif 15 en le coiffant, elle est immobilisée par exemple au moyen d'une vis de blocage 144. Elle présente en outre une ouverture 146 taraudée, centrée sur l'axe d'observation X-X. La deuxième partie 143B, de forme sensiblement tronconique, présente une base de plus grand diamètre fileté, adaptée à l'ouverture taraudée 146 de la première partie 143 A.

Ainsi, la distance entre la surface d'appui de la première partie 143A du manchon 143 sur l'objectif 15, et l'appui sur la surface d'observation du support peut être réglée avec une précision meilleure que la profondeur de champ de l'optique, 50 microns par exemple.

On a décrit, avec la vis de blocage 144 et la liaison par vissage des deux parties 143A, 143B du manchon 143, des moyens de réglage de la distance entre l'objectif 15 et la surface d'appui 145 du manchon 143 sur le support 19.

La hauteur du manchon 143 est telle que la position de la surface d'appui 145 ménagée à son extrémité libre est très légèrement supérieure à la position de la surface extérieure moyenne de la face inférieure de la plaque 19, lorsque celle-ci est en appui sur le rebord 41 du cadre en l'absence du manchon 143. La

surface de support 145 fait ainsi saillie avantageusement de 0,3 à 0,5 mm par rapport au plan moyen de la face inférieure de la plaque.

Dans ces conditions, la plaque 19 s'appuie toujours sur la surface 145 du manchon. En particulier, cet appui s'effectue au voisinage immédiat du fond du puits contenant l'échantillon à observer. Il a lieu sur toute la périphérie du fond du puits considéré, mais à l'extérieur de celui-ci, laissant ainsi libre toute la surface du fond pour l'observation de l'échantillon.

On se réfère maintenant à la figure 4 représentant un autre mode de réalisation préféré, dans lequel la source lumineuse est formée par un groupement de diodes électroluminescentes 261. La lumière émise par les diodes est rendue approximativement parallèle par des lentilles individuelles 263, puis est renvoyée sur l'échantillon par un système de guidage, de préférence une lentille de Fresnel 267. Des diodes électroluminescentes ont été décrites par exemple dans la demande européenne n° EP 1031326, incorporée à la présente par référence, dans le domaine dentaire, pour la polymérisation de résines.

De manière surprenante, il s'avère que de tels montages optiques peuvent être adaptés à l'illumination d'échantillons selon l'invention, et il est proposé dans l'invention décrite ici, pour la première fois, d'utiliser des diodes électroluminescentes pour illuminer un échantillon à analyser. Les avantages de ce type de sources lumineuses par rapport aux sources utilisées dans l'art antérieur sont multiples, tels que notamment le caractère stable et monochromatique de la lumière émise, le fait qu'il s'agit d'une source incohérente, évitant les problèmes de cohérence du laser pouvant produire des interférences ou des stries, la simplicité d'utilisation, l'allumage immédiat, la possibilité d'utiliser des longueurs d'ondes différentes, etc.

Les diodes électroluminescentes classiques ont une puissance d'émission généralement comprise entre 2 et 10 mW, plus typiquement entre 3 et 5 mW. Pour une utilisation dans le cadre de l'invention, il est préféré d'illuminer les échantillons avec une puissance de l'ordre de 1 à 10 mW environ, de sorte qu'un ensemble de diodes selon l'invention comprend avantageusement de 2 à 50 diodes, plus généralement de 5 à 40 diodes, par exemple de 5 à 20 diodes. Il est

entendu que la puissance du dispositif de diodes peut être inférieure, notamment de l'ordre de 0,5 mW, le temps d'exposition de l'échantillon étant alors augmenté.

5 L'entretoise 243 est formée essentiellement d'un support de sources lumineuses 269 et d'une coiffe tronconique 270, de préférence en métal, dans laquelle est montée la lentille de Fresnel 267.

10 Une réalisation particulièrement avantageuse consiste à disposer les diodes électroluminescentes 261 en couronne autour de l'objectif 15 sur le support de sources lumineuses 269, ledit support 269 présentant une plaquette annulaire 271 disposée orthogonalement par rapport à l'axe d'observation X-X, sur l'objectif 15. Il en résulte une plus grande facilité de séparation de la lumière excitatrice et de la lumière de fluorescence. Avantageusement, chaque diode 261 est surmontée d'une lentille 263 permettant de rendre les rayons émis par les diodes 261 parallèles entre eux.

15 Dans une réalisation préférée, les diodes électroluminescentes 261 émettent à des longueurs d'onde différentes, et l'on peut procéder à des illuminations successives du même échantillon à des longueurs d'onde différentes. Par exemple on choisira une première diode dont l'émission se situe à 470 +- 15 nm et une diode 550 +- 15 nm pour exciter des fluorophores  
20 différents. Dans ce cas, le dispositif comprend un ensemble de 2 à 50 diodes de chaque longueur d'onde désirée.

La largeur du faisceau incident rencontrant le fond du puits contenant l'échantillon à observer est telle que la totalité de la surface du puits est illuminée en même temps par le faisceau. Ainsi, la totalité de la surface de l'échantillon est  
25 excitée simultanément.

Dans le cas d'un montage en couronne de la (des) source(s) lumineuses, les trois axes, d'illumination, d'observation, et de caméra, peuvent coïncider.

30 En référence à la figure 5, on va maintenant décrire un autre mode de réalisation de l'invention.

Ce mode particulier concerne les échantillons qui se présentent sous forme de dépôts régulièrement disposés sur un filtre ou tout autre support opaque, et qui sont destinés à être lus par dessus plutôt que par dessous. On utilise alors



un support 319 d'épaisseur constante, sur lequel les échantillons peuvent être déposés directement ou sur lequel on posera une membrane filtrante où les échantillons auront été posés au préalable. Les dispositifs optiques sont les mêmes que pour la disposition inversée décrite en référence aux figures  
5 précédentes, tandis que le dispositif de maintien de mise au point consiste en un embout rigide ou entretoise 343 venant affleurer le dessous du support 319 et le soulevant légèrement. L'embout 343 est fixé de façon rigide à une pièce fixe par rapport à l'objectif 15, par exemple au bâti 344, ce qui rend invariante la distance entre les échantillons et l'objectif 15. Dans ce mode de réalisation, la surface  
10 d'appui 345 de l'embout 343 sur le support 319 porte sur la face du support opposée à l'objectif 15 et à la face d'observation.

On comprend que le fonctionnement de l'entretoise pour maintenir constante la distance séparant la face d'observation de l'objectif est analogue à ce qui a été décrit en référence à la figure 2.

15

Les dispositifs et procédés de l'invention peuvent être utilisés pour l'analyse d'échantillons d'origine et de nature diverses, marqués selon toute technique connue de l'homme du métier. Il peut s'agir notamment d'échantillons comprenant des cellules d'origine mammifère (animale ou humaine, par exemple  
20 cellules nerveuses, tumorales, immunitaires, etc.), bactérienne, végétale, de levure, d'organismes pathogènes, de virus, de tout échantillon ou prélèvement biologique, etc. Les procédés et dispositifs sont adaptés à l'analyse ou la détection de polypeptides, acides nucléiques, lipides, etc. Ils sont particulièrement utilisables pour la mesure de l'effet de composés tests,  
25 notamment de bibliothèques de produits, sur des populations de cellules, par exemple dans des tests à haut débit de l'efficacité, la sélectivité ou la toxicité de produits.

Ainsi, dans un mode particulier, l'invention réside également dans une méthode d'analyse (ou de screening) à haut débit utilisant un dispositif tel que  
30 décrit ci-avant, plus particulièrement dans lequel l'échantillon est composé d'une population de cellules mise en contact avec un colorant fluorescent représentatif d'une fonction cellulaire (e.g., prolifération, croissance, maturation, différenciation, mort, survie, apoptose, etc.), l'échantillon étant mis en contact,

dans des puits séparés d'une plaque, avec des composés d'une collection test, les composés faisant varier l'intensité du marquage de fluorescence étant mis en évidence. La population de cellules est par exemple une population de neurones, notamment d'origine humaine ou animale.

- 5 Dans un mode particulier, le colorant fluorescent est associé à un anticorps associé à un antigène cellulaire. Ces anticorps couplés sont disponibles dans le commerce, par exemple ceux produits par la société Immunotech (Marseille, France).

- 10 Selon un autre mode de mise en œuvre, l'invention réside dans un procédé de détection de la présence (ou de la quantité) d'une bactérie dans un ou plusieurs échantillons, comprenant la mise en contact de chaque échantillon avec un marqueur de la bactérie, et l'analyse de la présence du marquage au moyen d'un dispositif tel que décrit ci-avant. Ces marqueurs peuvent être très spécifiques de la bactérie, comme les sondes d'acides nucléiques spécifiques du  
15 génome bactérien associées à des marqueurs de fluorescence, ou non spécifiques tels que l'acridine orange et tous les colorants des acides nucléiques. On les trouve en abondance dans le commerce, voir par exemple le catalogue Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

- 20 Selon un autre mode de mise en œuvre, l'invention réside dans un procédé de détection de la présence (ou de la quantité) d'un virus dans un ou plusieurs échantillons, comprenant la mise en contact de chaque échantillon avec un marqueur spécifique du virus, et l'analyse de la présence du marquage au moyen d'un dispositif tel que décrit ci-avant.

- 25 Selon un autre mode de l'invention, le dispositif comporte des filtres sur le trajet de la lumière de fluorescence qui délimitent des zones spectrales, par exemple des filtres dichroïques à 530, 585, et 650 nanomètres permettent d'utiliser jusqu'à quatre marqueurs fluorescents différents, avec une seule excitation à 488 nm, ainsi qu'on le pratique en cytométrie de flux. Ces colorants permettent l'analyse de plusieurs paramètres sur la même cellule. De même le  
30 faisceau d'excitation peut associer deux sources, soit simultanément, au moyen d'un miroir dichroïque, soit successivement au moyen d'un miroir ordinaire mobile ou encore par séparation des angles solides d'excitation ainsi qu'il est décrit pour le dispositif de source en couronne, ce qui étend encore les

possibilités de l'analyse multiparamétrique. Si les acquisitions successives se font sans déplacement de l'échantillon, on peut procéder à l'analyse de corrélation des émissions pixel par pixel.

5 L'invention peut également être utilisée pour l'analyse de marquage sur billes, notamment d'interactions protéine-protéine, de complexes immuns, d'hybridations, etc.

10 Le mode d'acquisition à plusieurs longueurs d'onde est ici particulièrement avantageux, puisqu'il permet la discrimination de plusieurs catégories de particules. Si ces particules sont de taille homogène on peut distinguer des particules présentant des niveaux quantifiés de colorant fluorescent, par exemple une dizaine de niveaux différents. Ces particules peuvent être le siège de réactions analytiques, par exemple d'immunoanalyse, la réaction associée à chaque catégorie de particules peut être quantifiée par un autre marqueur, émettant à une autre longueur d'onde, la même pour toutes les réactions. On  
15 peut enregistrer ainsi autant de réactions analytiques différentes que l'on peut distinguer de catégories de particules.

Une autre utilisation de ce type de particules est le codage, lorsqu'elles sont associées à un processus de synthèse combinatoire. L'analyse des particules est le fidèle reflet du composé chimique associé, le contrôle de l'identification pouvant se faire en dehors du laboratoire où s'effectue la mesure,  
20 par transmission électronique des données.

Dans une autre utilisation, une population homogène de particules fluorescentes est utilisée pour définir une surface de correction pour l'énergie d'excitation, qui n'est pas uniforme sur tout le champ d'observation ; en particulier, les lasers présentent une distribution gaussienne de l'énergie. La  
25 mesure de l'énergie réémise par chaque particule reflète le niveau de l'énergie d'excitation au point où elle se trouve. Avec un petit nombre de particules réparties au hasard sur la surface observée, il est possible de définir une surface, par interpolation, qui servira ensuite à normaliser les niveaux des pixels observés sur des échantillons inconnus. Une surface émettrice uniforme peut  
30 aussi servir à cette normalisation. Cette opération est nécessaire lorsqu'on veut quantifier une réaction sur une cellule ou une particule réactive.

L'invention peut encore être utilisée pour analyser les dépôts d'acides nucléiques après hybridations avec des sondes, notamment sur puce, microarrays, etc. Il peut s'agir notamment de dépôts d'ADN après hybridation par des séquences correspondantes d'ADN ou d'ARN, issus d'une cellule ou d'un échantillon, et marqués par un élément fluorescent. Ces dépôts se présentent  
5 préférentiellement en arrangements réguliers présentant jusqu'à 5000 dépôts qui peuvent être lus en une seule fois par le dispositif. Plusieurs blocs de dépôts placés côte à côte peuvent être lus séquentiellement .

10 D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### Exemple 1

15

*Dispositif selon l'invention comprenant:*

- Un châssis de microscope inversé Olympus IX- 50 équipé d'un cube pour fluorescence MWIB, un objectif UMPLFL 5X
- Un laser Argon 488 nm, 25 mW, de marque Spectra-Physics
- 20 - Une caméra Hamamatsu C5985 refroidie et son contrôleur. Cette caméra dispose d'une plage de réglage importante du temps d'acquisition, depuis  $10^{-4}$  secondes jusqu'à 5 minutes. En utilisation normale selon l'invention le temps d'acquisition est compris entre 0,1 et 1 seconde. Le nombre de pixels est 376151, codés sur 8 bits, soit 256 niveaux, numérotés de 0 à 255. Le  
25 refroidissement du capteur représente 20°C en dessous de l'ambiance, assurant une sensibilité de 10 photons.
- Un ensemble de deux tables Märshaüser 120x100 mm et leur contrôleur de marque Lang.
- Un cadre porte-plaque ajusté aux plaques Nunc 384 puits et un couvercle  
30 coiffant la plaque en polymère organique noir, occultant le faisceau laser et la lumière ambiante.
- Un ensemble optique de mise en forme du faisceau laser, comportant deux lentilles convergentes, un filtre spatial (collimateur) de diamètre 30 microns.

- Une entretoise en forme de manchon coiffant l'objectif, en polymère organique noir.
  - Un plateau métallique supportant les différents éléments et le capotage de sécurité assurant la coupure du faisceau laser en cas d'ouverture.
- 5        - Un micro ordinateur PC, avec le logiciel AnalySIS de la société Soft Imaging System (Münster, Allemagne).

## Exemple 2

### 10        *Culture de neurones sur plaques 384 puits et comptage selon l'invention:*

Après dissection de la moelle épinière d'embryons de rat de 14 jours les neurones sont purifiés selon la technique décrite dans la demande de brevet européen n° EP99403092.2.

15        Les neurones purifiés sontensemencés dans des plaques 384 puits à l'aide d'un robot biomek 2000 dans les plaques préalablement traitées selon le protocole.

Dès que les neurones sont attachés au fond des puits (30 minutes à une heure plus tard), le traitement des cellules avec les molécules à tester est effectué par le robot.

20        Après 4 jours de culture on procède au test de survie consistant à traiter les cultures avec la calcéine-AM (Molecular Probes) qui devient fluorescent après pénétration dans les cellules vivantes.

La fluorescence émise par chacune des cellules présente dans les puits est détectée grâce à l'analyseur selon l'invention. L'acquisition des images des 384  
25        puits est faite en séquence automatique, avec un temps d'exposition de 0.2 seconde par puits, suivie de l'analyse effectuée automatiquement. La durée totale de l'opération est environ 14 minutes. Le résultat obtenu est présenté sous la forme d'un tableau comportant le comptage du nombre de neurones par puits. Le tableau suivant présente un échantillonnage des comptages, par  
30        comparaison au comptage à l'œil effectué au microscope à contraste de phase, en des points sélectionnés correspondant aux contours de la plaque et au milieu. La concordance des résultats témoigne de la régularité de la mise au point lors de l'acquisition automatique.

N° puits	manuel	Automatique
1	88	76
2	92	104
13	111	116
24	104	101
169	154	161
180	132	140
192	113	118
193	44	46
205	55	63
216	79	75
337	67	62
359	54	52
361	65	77
362	55	58
384	50	50

### Exemple 3

#### 5 Comptage de billes fluorescentes selon l'invention

On utilise une suspension de billes fluorescentes "Flow check fluorospheres" (Beckman Coulter, Miami, USA) calibrées au diamètre 10  $\mu\text{m}$ . Les billes sont déposées dans les puits par un robot de pipetage biomek 2000 (Beckman) à raison de 50 billes par puits, en moyenne, dans une moitié de la plaque (puits 1 à 192) et 100 billes par puits, en moyenne, dans l'autre moitié de la plaque (puits 193 à 384). Après décantation les billes sont comptées à l'œil par l'opérateur (10 puits par concentration, à différents emplacements de la plaque). Puis la plaque est lue par l'analyseur et les résultats sont comparés. On constate que les résultats par le comptage automatique donnent bien les moyennes attendues et que l'écart-type correspond bien à ce que l'on attend d'une statistique de Poisson. Sur les puits ayant fait l'objet d'un comptage visuel on constate une parfaite concordance avec le comptage automatique.

N° puits	manuel	Automatique
1	31	32
2	43	47
13	65	55
23	64	62
24	55	60
36	62	56
48	41	40
169	68	62
181	56	50
204	111	99
359	116	108
360	128	121
361	96	90
373	99	89
383	88	82
384	135	124

#### Exemple 4

##### 5 Dispositif selon l'invention comprenant :

- Un châssis de microscope inversé Olympus IX- 50 équipé d'un cube pour fluorescence MWIB, un objectif UplanFI 4X /0.13
- Une source comportant 20 diodes électroluminescentes bleue, émettant à 470 +/-15 nm , de marque Light Technologies, Marseille, France, positionnée à l'arrière du châssis à l'emplacement prévu par Olympus pour positionner la lampe d'excitation de fluorescence.
- Une caméra Hamamatsu C5985 refroidie et son contrôleur, identiques à celle de l'exemple 1.
- Un ensemble de table motorisée X-Y Prior Proscan 120x100 mm et leur contrôleur de marque Prior Instruments (Fulburn, UK).

- Une entretoise réglable coiffant l'objectif, en alliage d'aluminium anodisé noir.

- Un micro ordinateur PC, avec un logiciel d'acquisition et de comptage de la société Trophos (Marseille, France).



## REVENDICATIONS

1. Dispositif d'observation ou d'analyse d'un ou plusieurs échantillons disposés sur un support, notamment une plaque (19), comportant un objectif (15)  
5 d'observation d'au moins une partie d'un échantillon suivant un axe d'observation (X-X) depuis une face d'observation (29) du support (19 ; 319), une platine (17) de positionnement du support adaptée pour assurer un déplacement relatif entre le support (19 ; 319) et l'axe d'observation (X-X) dans un plan perpendiculaire à l'axe d'observation, tout en laissant libre le  
10 déplacement vertical, des moyens (21) d'illumination d'au moins une partie d'un échantillon et des moyens (23, 25, 53) d'acquisition d'une image en sortie de l'objectif (15), caractérisé en ce qu'il comporte une entretoise (43 ; 143 ; 243 ; 343) fixe par rapport à l'objectif (15) et présentant une surface d'appui (45 ; 145 ; 345) sur le support (19 ; 319), ladite surface d'appui étant  
15 située au voisinage de l'axe d'observation, de sorte que ladite entretoise (43 ; 143 ; 243 ; 343) est adaptée pour maintenir, sur l'axe d'observation (X-X), une distance constante entre l'objectif (15) et la face d'observation (29), au cours d'un déplacement relatif entre le support (19 ; 319) et l'axe d'observation (X-X).
- 20 2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens de réglage (143A, 143B, 144) de la distance entre l'objectif (15) et la surface d'appui (145).
3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le support (19) est une plaque comportant 96, 384, 864 ou 1536 puits.
- 25 4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'entretoise comporte un manchon (43 ; 143 ; 243 ; 343) s'étendant suivant l'axe d'observation (X-X), la surface d'appui étant formée par une plage annulaire (45 ; 145 ; 345) d'extrémité du manchon (43 ; 143 ; 343).
5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé  
30 en ce que les moyens d'acquisition (23, 25, 53) et les moyens d'illumination (21) comportent des moyens d'autocalibration pour réaliser une correction d'uniformité du faisceau d'illumination à partir de l'observation de billes fluorescentes de référence disposées sur la plaque portant les échantillons.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens d'illumination (21) sont adaptés pour couvrir simultanément l'essentiel de la surface d'un échantillon et en ce que l'objectif (15) et les moyens d'acquisition (23, 25, 53) sont adaptés pour procurer un champ d'observation couvrant simultanément l'essentiel de la surface de l'échantillon.
7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les moyens d'illumination (21) comprennent au moins une source lumineuse constituée d'une lampe, ou d'un laser.
8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les moyens d'illumination comprennent au moins une source lumineuse constituée d'un ensemble de diodes électroluminescentes (261).
9. Dispositif selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite source lumineuse comprend des diodes électroluminescentes (261) émettant à au moins deux longueurs d'onde différentes.
10. Dispositif selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une lentille (263, 267) permettant de faire converger la lumière émise par la source sur l'échantillon ou une partie de celui-ci.
11. Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte un ensemble de lentilles individuelles (263), chacune étant associée à une diode (261) respective.
12. Dispositif selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comporte une lentille (267), notamment une lentille de Fresnel, interposée entre les diodes électroluminescentes (261) et le support (19).
13. Dispositif selon l'une des revendications 8 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte un nombre de diodes (261) adapté pour produire sur l'objet une lumière correspondant à une puissance au moins égale à 2 mW.
14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisé en ce que les diodes électroluminescentes (261) sont disposées en couronne autour de l'objectif (15).
15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 7 à 14, caractérisé en ce que ladite source lumineuse (261) est solidaire de l'entretoise (243).

16. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'entretoise (43 ; 143 ; 243) est interposée entre la face d'observation (29) du support (19) et l'objectif (15), et présente une surface d'appui (45 ; 145) sur la face d'observation (29).
- 5 17. Dispositif selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'entretoise (43 ; 143 ; 243) est portée par l'objectif (15).
18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'objectif (15) est disposé au-dessus du support (319), tandis que l'entretoise (343) est disposée au-dessous du support (19) dans l'axe d'observation (X-X), de sorte que sa surface d'appui (345) porte sur la face du support (319) opposée à la face d'observation, et est solidaire d'une pièce fixe (344) par rapport à l'objectif (15).
- 10 19. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens d'illumination comportent des moyens (51) de guidage du faisceau d'illumination au travers de l'entretoise ou du manchon (43).
- 15 20. Dispositif selon la revendication 19, caractérisé en ce que les moyens de guidage du faisceau d'illumination comportent une fibre optique.
21. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un microscope (11), notamment d'un microscope d'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés côte à côte.
- 20 22. Dispositif d'observation ou d'analyse d'un ou plusieurs échantillons disposés sur un support, notamment une plaque (19), comportant un objectif (15) d'observation d'au moins une partie d'un échantillon suivant un axe d'observation (X-X) depuis une face d'observation (29) du support (19), et des moyens d'illumination d'au moins une partie d'un échantillon, caractérisé en ce que lesdits moyens d'illumination comportent un ensemble de diodes électroluminescentes (261).
- 25 23. Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que ledit ensemble comprend des diodes électroluminescentes (261) émettant à au moins deux longueurs d'onde différentes.
- 30

24. Dispositif selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une lentille (263, 267) permettant de faire converger la lumière émise par ledit ensemble de diodes (261) sur l'échantillon ou une partie de celui-ci.
25. Dispositif selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il comporte un ensemble de lentilles individuelles (263), chacune étant associée à une diode (261) respective.
26. Dispositif selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce qu'il comporte une lentille (267), notamment une lentille de Fresnel, interposée entre les diodes électroluminescentes (261) et le support (19).
27. Dispositif selon l'une des revendications 22 à 26, caractérisé en ce qu'il comporte un nombre de diodes (261) adapté pour produire une lumière sur l'objet correspondant à une puissance au moins égale à 2 mW.
28. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 22 à 27, caractérisé en ce que les diodes électroluminescentes (261) sont disposées en couronne autour de l'objectif (15).
29. Procédé d'observation séquentielle de plusieurs échantillons disposés côte à côte sur un même support, notamment une plaque (19 ; 319), caractérisé en ce qu'il comporte l'utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes.
30. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour l'analyse d'une série d'échantillons, notamment pour l'analyse ou la détection de cellules ou de particules ayant réagi avec des polypeptides, lipides ou acides nucléiques.
31. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour l'analyse d'une série d'échantillons de populations cellulaires, sur lesquelles on veut procéder à un dénombrement, à des tests de viabilité ou à des tests d'expression d'antigènes, ou à des tests morphométriques, en mode statique ou cinétique.
32. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour l'analyse d'une série d'échantillons dans lesquels on cherche à dénombrier des bactéries.
33. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour l'analyse d'une série d'échantillons contenant diverses catégories de

micro billes, chaque catégorie étant le support d'une réaction analytique avec ledit échantillon.

- 5 34. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 28 pour l'analyse d'une série d'échantillons, présentant des arrangements de dépôts d'ADN, sur lesquels ont réagi des sondes nucléiques provenant dudit échantillon, ces sondes étant rendues fluorescentes soit avant soit après l'hybridation.

1/4

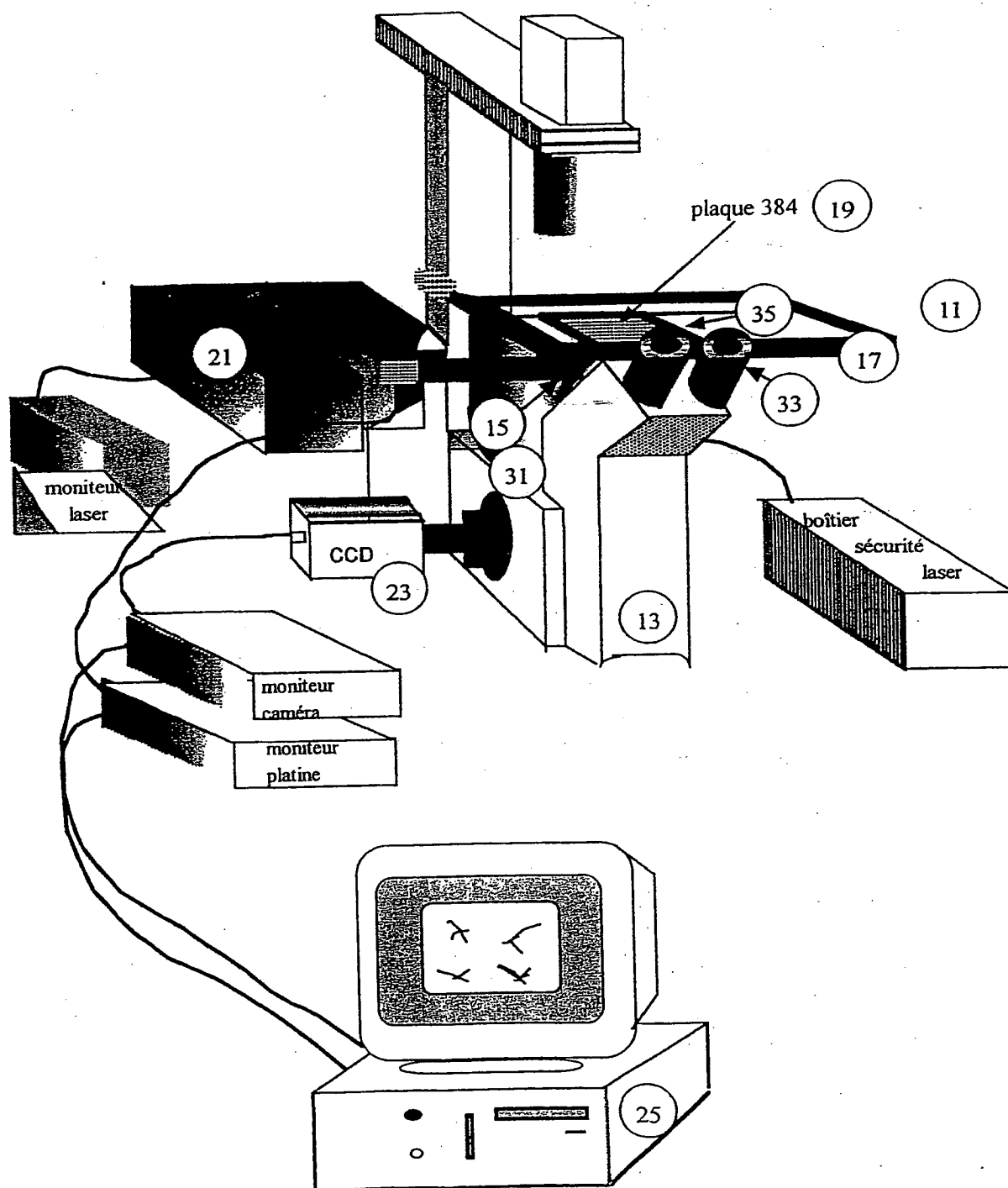


Figure 1 Dispositif d'analyse de particules

2/4

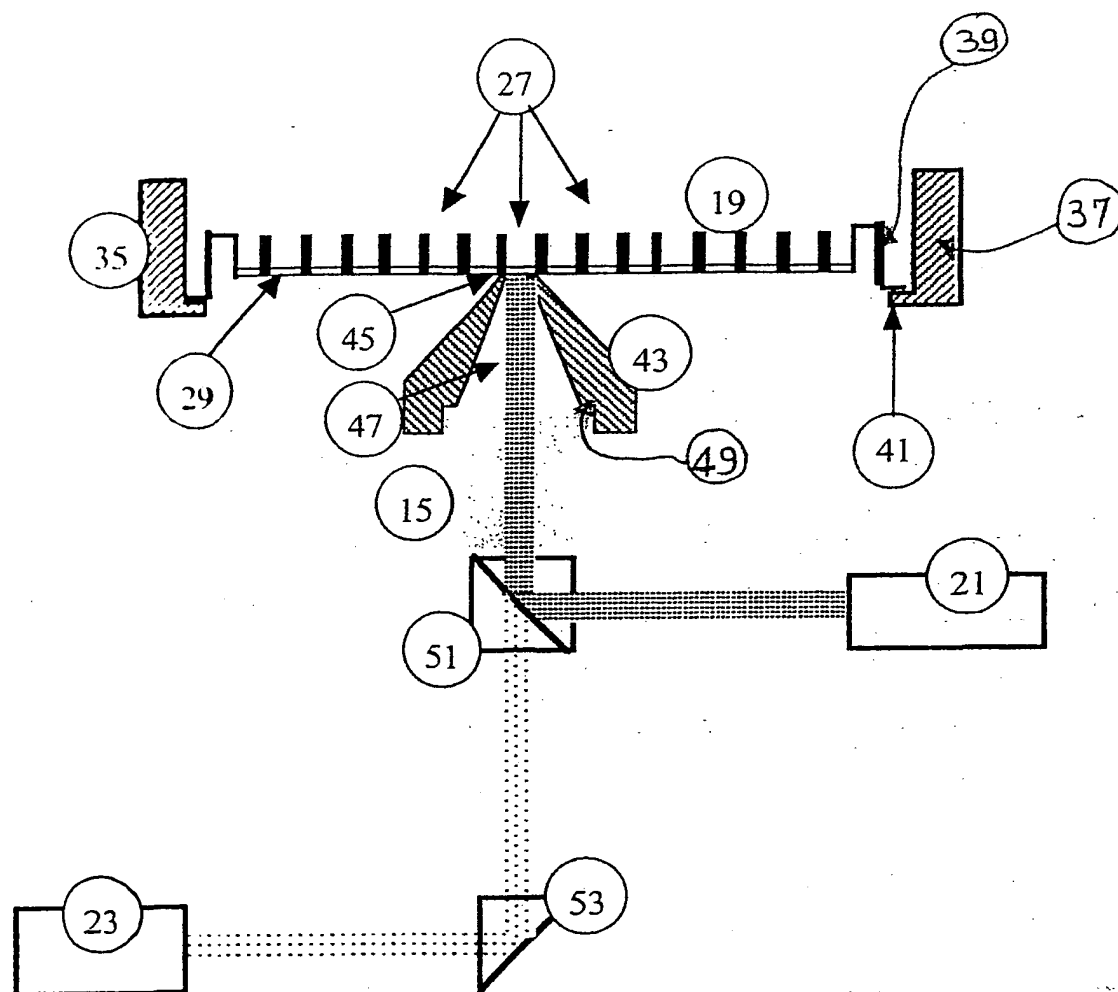


Figure 2 Positionnement de la plaque sur l'objectif

3/4

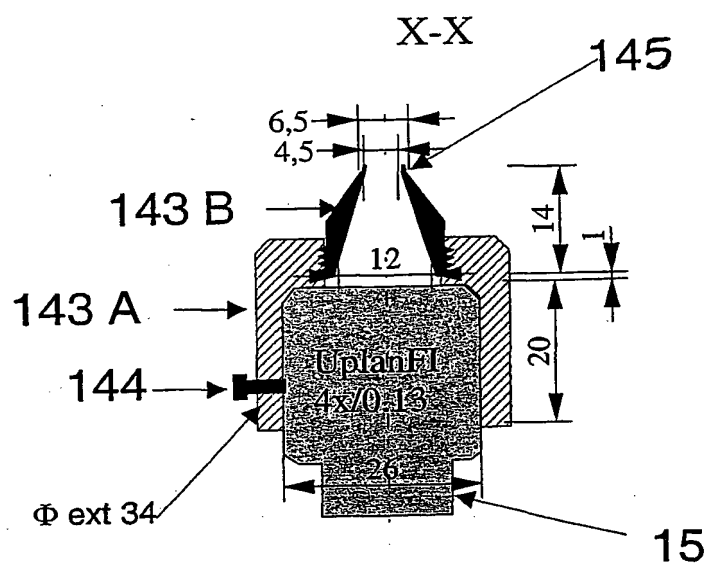


Figure 3: (cotes en mm)

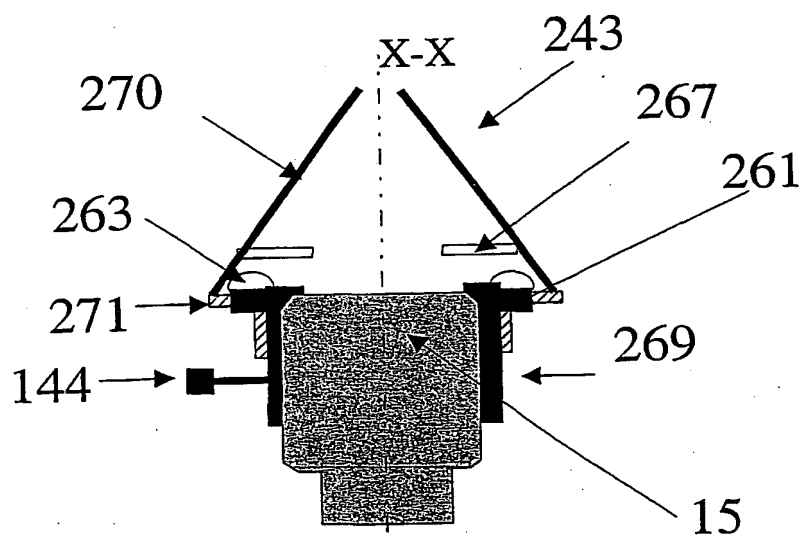


Figure 4



4/4

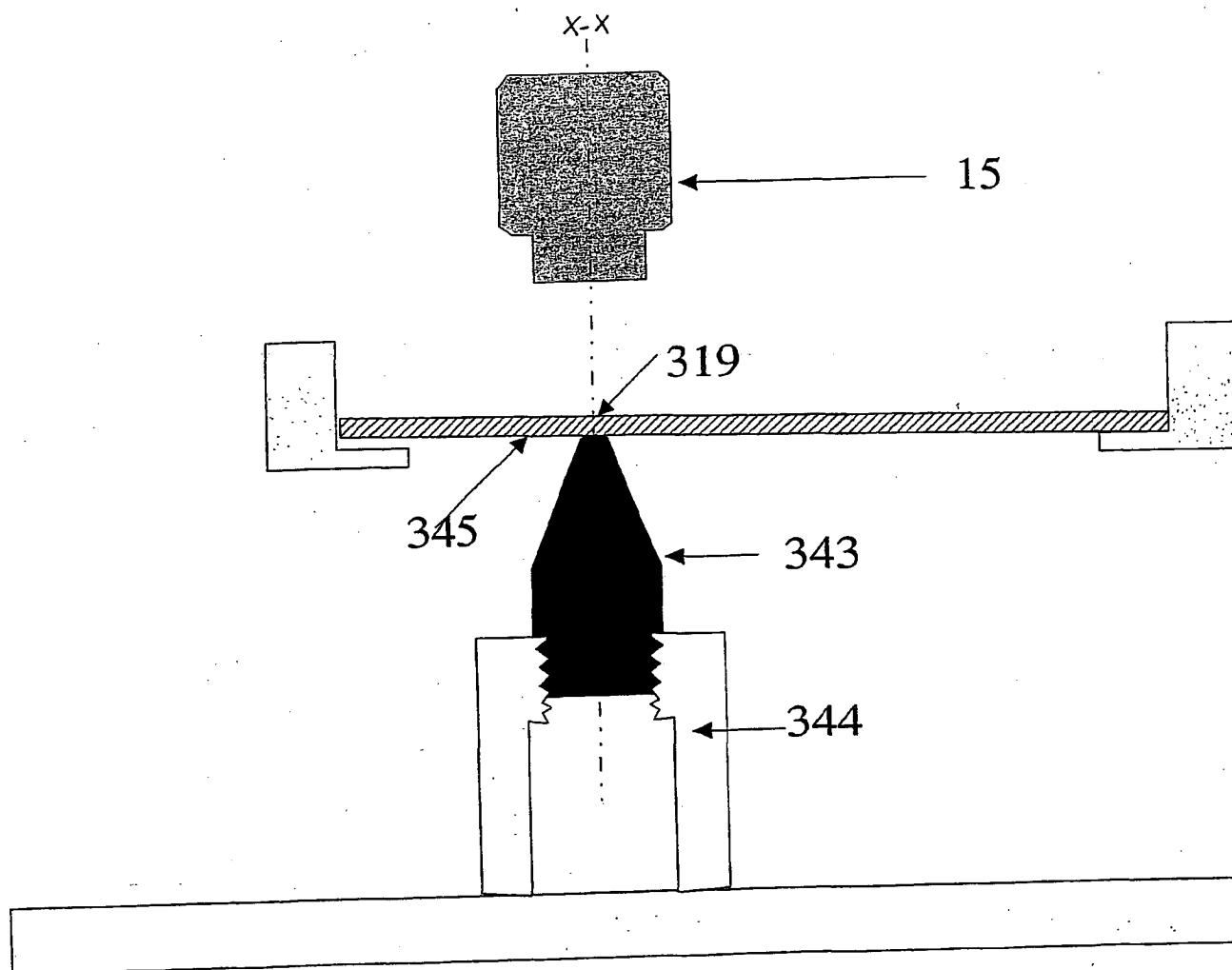


Figure 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 01/01412

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G02B21/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 764 409 A (COLVIN JAMES BARRY) 9 June 1998 (1998-06-09) column 2, line 47 -column 3, line 24 column 5, line 3 -column 6, line 48 column 9, line 6 -column 10, line 6	1, 29-34
A	FR 2 312 044 A (GEOMETRIC DATA CORP) 17 December 1976 (1976-12-17) page 5, line 26 -page 6	1, 29-34
A	CH 508 888 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 15 June 1971 (1971-06-15) the whole document	1, 29-34
A	US 5 671 086 A (FISH RICHARD H ET AL) 23 September 1997 (1997-09-23) column 6, line 12 - line 37	1, 29-34
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 2001

Date of mailing of the international search report

27/07/2001

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mollenhauer, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01412

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 2 256 245 A (FRICKE H)  16 September 1941 (1941-09-16)  the whole document</p> <p>-----</p>	1,29-34

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01412

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5764409	A	09-06-1998	AU 2817997 A EP 0895607 A JP 2000510606 T WO 9741479 A	19-11-1997 10-02-1999 15-08-2000 06-11-1997
FR 2312044	A	17-12-1976	DE 2621811 A JP 51143346 A	02-12-1976 09-12-1976
CH 508888	A	15-06-1971	BE 733536 A ES 368125 A FR 1577490 A LU 58798 A	03-11-1969 01-05-1971 08-08-1969 28-10-1969
US 5671086	A	23-09-1997	NONE	
US 2256245	A	16-09-1941	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 01/01412

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G02B21/26

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G02B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 764 409 A (COLVIN JAMES BARRY) 9 juin 1998 (1998-06-09) colonne 2, ligne 47 -colonne 3, ligne 24 colonne 5, ligne 3 -colonne 6, ligne 48 colonne 9, ligne 6 -colonne 10, ligne 6 ---	1, 29-34
A	FR 2 312 044 A (GEOMETRIC DATA CORP) 17 décembre 1976 (1976-12-17) page 5, ligne 26 -page 6 ---	1, 29-34
A	CH 508 888 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 15 juin 1971 (1971-06-15) le document en entier ---	1, 29-34
A	US 5 671 086 A (FISH RICHARD H ET AL) 23 septembre 1997 (1997-09-23) colonne 6, ligne 12 - ligne 37 ---	1, 29-34
	---	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*S\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 juillet 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/07/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mollenhauer, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 01/01412

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 2 256 245 A (FRICKE H) 16 septembre 1941 (1941-09-16) le document en entier</p>	1,29-34

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/01412

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5764409	A	09-06-1998	AU 2817997 A EP 0895607 A JP 2000510606 T WO 9741479 A	19-11-1997 10-02-1999 15-08-2000 06-11-1997
FR 2312044	A	17-12-1976	DE 2621811 A JP 51143346 A	02-12-1976 09-12-1976
CH 508888	A	15-06-1971	BE 733536 A ES 368125 A FR 1577490 A LU 58798 A	03-11-1969 01-05-1971 08-08-1969 28-10-1969
US 5671086	A	23-09-1997	AUCUN	
US 2256245	A	16-09-1941	AUCUN	